Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. H. Schweitzer

UNTERSUCHUNG ZUM NACHWEIS DER GALAKTOSE-1-PHOSPHATURIDYLTRANSFERASE (E.C.: 2.7.7.12) IN BLUTSPUREN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

JOHANNES KRAMER

1981

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538106_0020

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. H. Schweitzer

UNTERSUCHUNG ZUM NACHWEIS DER GALAKTOSE-1-PHOSPHATURIDYLTRANSFERASE (E.C.: 2.7.7.12) IN BLUTSPUREN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

JOHANNES KRAMER

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf:

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof.Dr.M.Straßburg

Referent
gez.: Prof.Dr.H.Schweitzer

Korreferent
gez.: Prof.Dr.G.Röhrborn

Untersuchung zum Nachweis der Galaktose-1-Phosphaturidyltransferase in Blutspuren (E.C.:2.7.7.12)

Inhaltsübersicht

1. Einleitung
1.1. Ziel der Untersuchung
1.2. Isoenzyme
1.3. Isoenzyme in der forensischen Medizin
1.3.1. SEP
1.3.2. 6-PGD
1.3.3. PGM_1
1.3.4. AK
1.3.5. ADA
1.3.6. GPT
1.3.7. EsD
1.3.8. GLO I
1.4. gt in der forensischen Blutspurenkunde
1.5. Vorstellung des Isoenzyms gt

2. Material und Methoden
2.1. Untersuchungsmaterial
2.2. Verwendete Gerätschaften
2.3. Verwendete Substanzen
2.4. Anfertigung von Blutspuren
2.5. Aufbewahrung des Spurenmaterials
2.6. Spurenaufbereitung
2.7. Hämolysatherstellung
2.8. Vergleichsblut
2.9. Vorbereitung der Hämolysate für die Elektrophorese
2.10. Stärkegelelektrophorese
2.10.1. Herstellung des Brückenpuffers
2.10.2. Herstellung des Stärkegels
2.10.3. Einsetzen der Blutproben
2.10.4. Färbeverfahren

3. Ergebnisse
3.1. ermittelte gt-Phänotypen
3.2. schematische Darstellung der ermittelten gt-Phänotypen
3.3. photographische Darstellung eines Zymogramms mit verschiedenen gt-Phänotypen
3.4. Einzelergebnisse
3.4.1. gt(N)
3.4.2. gt(N-D)
3.4.3. gt(N-LA)
3.4.4. gt(D)

4. Diskussion
4.1. Anmerkungen zur Methodik
4.2. Anmerkung zum verwendeten Spurenmaterial
4.3. Anmerkung zur Blutspurenuntersuchung in der forensischen Medizin

5. Zusammenfassung

1. Einleitung

1.1. Ziel der Untersuchung

Ziel dieser Arbeit ist es, Untersuchungen zum Nachweis der Galaktose-1-Phosphaturidyltransferase (Abk. gt) in Blutspuren durchzuführen.
In der Blutspurendiagnostik lassen sich bisher die Phänotypen einiger weniger Isoenzymsysteme über einen längeren Zeitraum sicher erfassen (SCHLEYER und OEPEN, 1977). Für die Darstellung der jeweiligen Phänotypen bieten sich bis auf wenige Ausnahmen die Methoden an, die sich an Frischblutproben bereits bewährt haben.
Unter anderem haben KÜHNL und Mitarbeiter (1974), HAASS, HAASS und HENKE (1979) sowie WEISSMANN und Mitarbeiter (1980) Untersuchungen zum Polimorphismus wie auch zur Alterungsstabilität des o.g. Isoenzymsystems durchgeführt. Somit sind die Untersuchungen zur spurenkundlichen Anwendung der gt eine sinnvolle Fortsetzung der zuvor genannten Arbeiten.

1.2. Isoenzyme

Der Begriff Isoenzym (Isozym, syn.) wurde von MARKERT und MØLLER (1959) geprägt. Über den Entstehungsmechanismus der Isoenzymsysteme liegen ausführliche Abhandlungen von HARRIS (1971) vor.
Nähere Erläuterungen zur Funktion, Pathophysiologie sowie zum Nachweis der gt finden sich zusammenfassend bei HAASS (1980).

1.3. Isoenzymsysteme in der forensischen Medizin

In Deutschland werden für blutspurenkundliche Zwecke einige Isoenzymsysteme routinemäßig untersucht. In der nachfolgenden Tabelle werden diese Enzyme vorgestellt. In der linken Spalte sind die einzelnen Systeme mit ihren E.C.-Nummern aufgelistet. Die rechte Spalte weist den jeweils erstbeschreibenden Autor aus.

Tabelle 1: Isoenzympolimorphismen in der forensischen Blutspurenkunde (mod. nach MARTIN, 1979)

S E P	(E.C.:3.1.3.2)	HOPKINSON und Mitarb.	1963
6-P G D	(E.C.:1.1.1.44)	FILDES u. PARR	1963
P G M_1	(E.C.:2.7.5.1)	SPENCER u. Mitarb.	1964
A K	(E.C.:2.7.4.3)	FILDES u. HARRIS	1966
A D A	(E.C.:3.5.4.4)	SPENCER u. Mitarb.	1968
G P T	(E.C.:2.6.1.2)	CHEN u.GIBLETT	1971
E s D	(E.C.:3.1.1.1)	HOPKINSON u. Mitarb.	1973
G L O	(E.C.:4.4.1.5)	KÖMPF u. Mitarb.	1975

Abkürzungen:

SEP	saure Erythrocytenphosphatase
6-PGD	6-Phosphogluconatdehydrogenase
PGM_1	Phosphoglucomutase$_1$
AK	Adenylatkinase
ADA	Adenosindesaminase
GPT	Glutamatpyruvattransaminase
EsD	Esterase D
GLO I	Glyoxalase I

Neben SCHLEYER und OEPEN (1977) geben auch PERLICK und Mitarbeiter (1977) einen Überblick über die gebräuchlichsten Isoenzymmerkmale in der forensischen Blutspurenkunde. Nachstehend sollen die spurenkundlichen Erkenntnisse wiedergegeben werden. Die einzelnen Isoenzymsysteme werden gemäß Tabelle 1 in chronologischer Reihenfolge vorgestellt.

1.3.1. SEP

Über dieses Isoenzym liegen hinsichtlich seiner Nachweisbarkeit an Blutspuren die unterschiedlichsten Zeitangaben vor. Das mag nicht zuletzt an den Unterschieden liegen, wie sie zwischen einer Lagerung von Blutspuren unter idealen Laborbedingungen und einem Auffinden solcher Spuren in der forensischen Praxis zu beobachten sind. Während HEIDEL (1968) einen SEP-Phänotypennachweis an 30 Tage alten Blutspuren erbringt, beschreibt SMERLING (1969) einen solchen Nachweis an lediglich 30 Stunden gelagerten Blutspuren. BRINKMANN und Mitarbeitern (1972) gelingt es, SEP-Phänotypen noch an 2 Monate alten Spuren nachzuweisen. Einige Jahre später wird von BRINKMANN und Mitarbeitern (1979) ein SEP-Phänotypennachweis sogar an 300 Tage alten Blutspuren erbracht.

1.3.2 6-PGD

6-PGD-Phänotypen können von BRINKMANN und DIRKS (1971) über einen Zeitraum von 4 Wochen nachgewiesen werden. Einen anderen Hinweis zur Stabilität einer 6-PGD-Variante (vermutlich der Richmond-Variante) gibt HENKE (1979). Nach mehrmaligem Auftauen eines Hämolysats der gleichen Blutprobe finden sich im zugehörigen Zymogramm derartig gravierende Unterschiede, daß die einzelnen Fraktionen,

obgleich vom selben Probanden, unterschiedliche Muster zeigen. Sicherlich ist dieses Faktum bei einem möglichen spurenkundlichen Nachweis der 6-PGD in Zukunft zu berücksichtigen.

1.3.3. PGM_1

Typen der PGM_1 gehören neben denen der AK zu den wenigen Merkmalen, die sich über längere Zeiträume sicher erfassen lassen. CULLIFORD (1964) erbringt einen PGM_1-Phänotypennachweis an 3 Monate alten Spuren. OEPEN (1970) beschreibt einen solchen Nachweis an bis zu 20 Wochen alten Blutspuren. MISCICKA und Mitarbeiter (1977) berichten über einen PGM_1-Phänotypennachweis an 24 Wochen altem Blut. In einem Fall soll der Nachweis noch nach 126 Wochen geglückt sein. BERG und LADIGES (1979) stellen PGM_1-Typen mittels isoelektrischer Fokussierung an 18 Monate alten Blutproben dar.

1.3.4. AK

CULLIFORD und WRAXALL (1968) können AK-Phänotypen an 5-6 Monate alten Blutspuren sicher zur Darstellung bringen. Dieses Ergebnis deckt sich weitgehend mit den von OEPEN und DURÉ (1970), ROTHWELL (1970) und TSUJI-WEISSMANN (1976) gemachten Untersuchungen. Nach BRINKMANN (1971) läßt sich ein sicherer Phänotypennachweis über einen 11-monatigen Zeitraum führen.

1.3.5. ADA

OEPEN und MERTENS (1973) stellen Banden von ADA-Phänotypen nach einer Lagerzeit von 1-3 Wochen dar. Allerdings treten in einigen Fällen bereits zwischen dem 2-8 Tag Transformationen auf, die zumindest eine ADA-Befungung in Strafprozessen bedenklich erscheinen lassen. BRINKMANN (1971) gelingt es, ADA-Phänotypen nach 5 Monaten eindeutig nachzuweisen.

1.3.6. GPT

WELCH (1975) beschreibt einen GPT-Phänotypennachweis über den relativ kurzen Zeitraum von 14 Tagen.

1.3.7. EsD

PARKINS und ADAMS (1975) berichten über einen Versuch, bei dem einzelne EsD-Phänotypen bis zu einem Zeitraum von 3 Wochen nachweisbar blieben. Im gleichen Jahr gelingt HAYWARD und BOSWORTH (1975) ein Phänotypennachweis an 4 Wochen alten Spuren. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit den von BRINKMANN (1978) gewonnenen Erkenntnissen. Ihm gelang der EsD-Phänotypennachweis nur an ganz frischen Blutspuren.

Auch dieser Fall dokumentiert einmal mehr, welche Problematik der Isoenzymnachweis in der forensischen Blutspurenkunde aufwirft. Die Nachweisbarkeitsgrenzen der einzelnen Phänotypen zeigen erhebliche Unterschiede. Inwieweit die Technik des Enzymnachweises eine Rolle spielt, mag dahingestellt bleiben. Auf jeden Fall sollte der Leser solcher Veröffentlichungen (besonders wenn wie o.a. extreme Unterschiede in den Nachweisbarkeitsgrenzen vorliegen) nicht die kritische Aufmerksamkeit fehlen lassen.

1.3.8. GLO I

Über die Nachweisbarkeitsgrenzen der Phänotypen dieses Isoenzyms liegen unterschiedliche Angaben vor. Ein Versuch von BRINKMANN (1978), GLO I -Phänotypen an Blutspuren nachzuweisen, brachte keinen Erfolg. SCHWERD (1980) gelingt ein solcher Glyoxalase-Nachweis noch nach Monaten.

1.4. gt in der forensischen Blutspurenkunde

Über einen Nachweis von gt-Phänotypen an Blutspuren liegen bis heute noch keine Angaben vor. Es soll daher versucht werden, einen solchen Nachweis zu erbringen.
Außerdem soll dabei die Frage berücksischtigt werden, welchen Wert die gt für die forensische Blutspurenkunde haben kann.

1.5. Vorstellung des Isoenzyms gt

Gt ist ein Isoenzym des Galaktose-Stoffwechsels, das einem autosomal-kodominaten Erbgang folgt.

Bei der nachstehend beschriebenen Reaktion fungiert gt als Katalysator:

$$\text{Gal-1-P} + \text{UDP-Glu} \xrightleftharpoons{\text{gt}} \text{UDP-Gal} + \text{Glu-1-P}$$

Dieser Mechanismus wurde von Leloir (1951) zuerst entdeckt. Zu seiner Zeit war über die einzelnen Phänotypen der gt noch nichts bekannt. Das änderte sich jedoch mit der Entwicklung neuer Nachweistechniken sehr schnell. An dieser Stelle seien lediglich die Zymogrammtechnik und die Elektrophorese erwähnt, da sie die Grundlage meiner Untersuchungen darstellen.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial fand ausschließlich venöses, heparinisiertes Vollblut (Liquemin^{R}) Verwendung. Das Blut wurde Personen beiderlei Geschlechts und unterschiedlichen Alters durch Venenpunktion entnommen. Insgesamt stellten sich 35 Personen für meine Untersuchung zur Verfügung. Einigen Probanden wurde mehrfach Blut entnommen, so daß insgesamt 55 Vollblutproben untersucht werden konnten.
Das frische venöse Vollblut wurde mit 2-3 Tropfen Heparin versetzt und bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2. Verwendete Gerätschaften

Die elektrophoretischen Untersuchungen wurden nach einem von SPARKES und Mitarbeitern (1977) beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Es wurden folgende Geräte benutzt:

a) transparente Elektrophoresekammer [1)]
   Abmessungen: Länge 35,5 cm
   Breite 26,5 cm — s. Abb. 1
   Höhe 8,5 cm
   Die Kammer ist zur Aufnahme von 2000 ml Pufferlösung geeignet.

b) Gelkammer [2)]
   Abmessungen: Länge 27 cm
   Breite 22,5 cm — s. Abb. 1
   Höhe 2,3 cm

c) Netzgerät [3)]

---

1) + 2) Fa. Beyer & Enders, in Düsseldorf

3) Fa. Vogel, in Giessen / Typ. LS 120 R/S

2.3. Verwendete Substanzen

- Tris(hydroxymethylaminomethan)	Merck Nr.8382
- EDTA (Versen Na_2-Salz)	Serva Nr.11280
- Histidin HCl	Sigma Nr.H-7875
- Serva Stärke	Serva Nr.35370
- $MgCl_2$	Merck Nr.5832
- Galaktose-1-Phosphat	Boehringer Nr.104990
- NADP	" " 128040
- UDP-Glucose	" " 110060
- Glucose-1,6-Diphosphat	" " 126993
- Phosphoglucomutase	" " 108375
- Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	" " 127043
- Phenacin Methosulfat (MTT)	Serva Nr.20395
- 3(4,5-Dimethylthiazolyl-2-) 2,5-diphenyltetrazoliumbromid (PMS)	Serva Nr.32030
- Agarose	Difco Laboratories Nr. 537353

2.4. Anfertigung von Blutspuren

Von jeweils einer der o.a. Vollblutproben wurde mit einer Mikropipette ca. 100 µl Blut auf Spurenträgermaterial aufgetropft. Als Spurenträger dienten schmale Streifen aus PVC-Folie.
Es wurden auf jeweils 3 Spurenträgerstreifen je drei Blutstropfen (a 100 µl) aufgetragen.

Die als Spurenträger benutzte Folie erwies sich als ideal für die Blutspurenuntersuchung. Sie ließ sich sehr leicht auf jede beliebige Größe zuschneiden, nahm wenig Lagerungsfläche in Anspruch und war ohne Schwierigkeiten zusammen mit der aufgetragenen Spur leicht in ein Zentrifugenröhrchen einzubringen.
Daneben konnten die aufgetragenen Blutspuren ohne großen technischen Aufwand von diesem Material aufgenommen werden.

2.5. Aufbewahrung des Spurenmaterials

Während eine Serie der o.g. Streifen bei Zimmertemperatur (18-23°C) dem normalen Tageslicht ausgesetzt wurde, wurde die zweite in einem dunklen Raum aufbewahrt, um eine Beeinflußung durch UV-Strahlen zu vermeiden. Die Temperatur betrug ebenfalls 18- 23°C. Eine dritte Serie wurde bei + 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.6. Spurenaufbereitung

Nach 3 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden wurde jeweils eine Blutspur aufgenommen und aufbereitet.

Alle 3 Stunden alten Spuren wurden wie folgt aufbereitet: Spurenträger und Blutspur wurden zusammen in ein Zentrifugenröhrchen eingebracht. Dann wurden ca. 5ml physiologischer Kochsalzlösung (18-23°C) dazugegeben. Die Blutspur wurde bei 500 g 5 min lang zentrifugiert.
Der Überstand oberhalb des Erythrozytensediments wurde anschließend abgesaugt und das Trägermaterial mit einer Pinzette entfernt. Mit dieser Technik konnte jede der 3 Stunden alten Spuren aufbereitet werden. Nur vereinzelt blieben geringste Reste der Spur auf dem Trägermaterial zurück.

Schwieriger war dagegen die Gewinnung älterer Spuren. Sie waren bei der Aufbereitung bereits angetrocknet oder bereits vollständig durchgetrocknet. Zur Gewinnung solcher Blutspuren erwies sich folgendes Verfahren als geeignet:

Mit einer Pinzette wurden die Spuren von ihrer Unterlage abgehoben bzw. abgekratzt und in ein Glasröhrchen eingebracht. Danach wurde etwa 50 µl Aqua dest (18-23°C) hinzugefügt und die Blutspuren für 2-3 Stunden im Kühlschrank bei +4°C gelöst.

Die anstelle von Aqua dest. verwendete physiologische Kochsalzlösung (18-23°C) brachte im Verlauf der Untersuchungen keine besseren Ergebnisse. Daher wurde auf dieses Verfahren im weiteren Verlauf verzichtet.
Nachdem die Blutspuren gelöst waren, wurden sie bei -20°C eingefroren.

2.7. Hämolysatherstellung

Die Freisetzung der gt aus den roten Blutzellen wurde durch Hämolyse erreicht. Es empfiehlt sich, die Erythrocytenmembranen durch Einfrieren oder durch Zugabe von hypotonen Lösungenen, wie Aqua dest., zu zerstören.

2.8. Vergleichsblut

Parallel zu den o.g. Blutspuren wurde in das Elektrophoresegel jeweils ein Vergleichshämolysat mit eingesetzt. Blutspuren und Vergleichsblut wurden aus der selben Vollblutprobe gewonnen. Veränderungen der gt-Phänotypen, wie sie etwa durch eine längere Lagerung entstehen können, waren so direkt kontrollierbar.

Bei der Herstellung des Vergleichshämolysates hielt ich mich weitgehend an ein von HAASS (1980) angewndetes Verfahren.
Etwa 1 ml Vollblut wurde mit ca. 5 ml physiologischer Kochsalzlösung (18-23°) aufgeschwemmt und bei 500 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Dieser als "Waschen" bezeichnete Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Danach wurde das Hämolysat bei -20°C tiefgefroren.

2.9. Vorbereitung der Hämolysate für die Elektrophorese

Nach einer Verweildauer der tiefgefrorenen Hämolysate von 2-8 Tagen in der Tiefkühltruhe, wurden die Proben aufgetaut. Anschließend folgte ein Aufschütteln mit der gleichen Menge Toluol. Danach wurde bei 1800 g 20 min zentrifugiert. Der

Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Durch dieses Vorgehen konnten die Stromaanteile der roten Blutzellen weitgehend eliminiert werden.

2.10. Stärkegelelektrophorese

Die horizontale Stärkegelelektrophorese führte ich nach einer von SPARKES und Mitarbeitern (1977) vorgestellten Methode durch.

2.10.1. Herstellung des Brückenpuffers

0,15 M Tris

0,004 M EDTA

0,1 M DL-Histidin HCl

Bezogen auf die o.g. 2000 ml Elektrophoresekammer ergaben sich daraus folgende Mengenverhältnisse:

36,3 g Tris

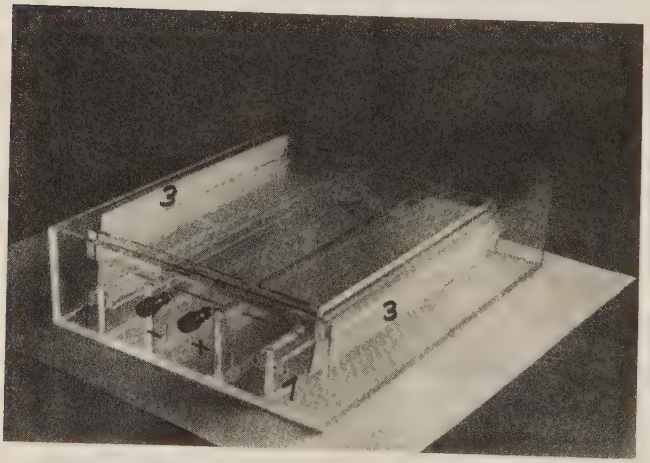
3,0 g EDTA

38,4 g DL-Histidin HCl

Jede der angegebenen Substanzen wurde zunächst vollständig in Aqua dest. (18-23°C) gelöst, bevor sie in der o.a. Reihenfolge zusammengegeben wurden. Mit Aqua dest (18-23°C) wurde die Pufferlösung auf 2000 ml aufgefüllt. Die Lösung zeigte einen pH-Wert von 7,8. Der Brückenpuffer wurde in die Puffertröge der Elektrophoresekammern eingegeben und bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt.
(siehe auch Abbildung 1)

Abbildung 1: (Beyer & Enders-Elektrophoresekammer mit Gelkammer)

1 = Puffertröge
2 = Gelkammer
3 = Filterpapierstreifen (Sie stellen den Kontakt zwischen Pufferlösung und Gel her.)



2.10.2.

Das Stärkegel wurde aus 60 g Serva-Stärke, 450 ml Aqua dest. und 50 ml Brückenpuffer (1:10 verdünnt) gekocht. Anschließend wurde es in die Gelkammer (siehe Abb. 1) eingegossen. Das nach ca. 20 min erstarrte und erkaltete Gel wurde für ca. 1-2 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Um ein Austrocknen zu verhindern wurde es zusätzlich mit einer PVC-Folie abgedeckt.

2.10.3. Einsetzen der Blutproben

Zunächst wurden in das erkaltete Gel mit einer Stanze 5 cm vom kathodenwärts gelegenen Rand der Gelkammer 5 mm breite Schlitze eingestanzt.
In diese Schlitze wurden die mit Untersuchungsmaterial getränkten Filterpapierstreifen (Schleicher & Schüll, Nr. 2668) eingesetzt. Die Gelkammer wurde so in die Puffertröge eingesetzt, daß sich die Proben an der Kathodenseite befanden.
Bei ca. 8,5 V/cm betrug die Laufzeit der Elektrophorese 18 Stunden.

2.10.4. Färbeverfahren (nach BISSBORT und KÖMPF (1973))

Es wurden drei Bechergläser bereitgestellt, in die folgende Substanzen eingewogen wurden:

1. Becherglas

20 mg Galaktose-1-Phosphat
10 mg NADP
15 mg UDP-Glucose
02 mg Glucose-1,6-Diphosphat

Diesem Gemisch wurden 10 ml 0,3 M Trispuffer, 25 µl Phosphoglucomutase, 50 µl Glucose-6-Phosphatdehydrogenase und 1 ml 0,2 M $MgCl_2$-Lösung zugesetzt.

2. Becherglas

20 mg MTT wurden mit 10 ml Aqua dest. gelöst.

3. Becherglas

10 mg PMS wurden mit 10 ml Aqua dest. gelöst.

Von den gelösten Substanzen wurden aus Becherglas 2 und 3 je 1 ml zu Becherglas 1 hinzugefügt.

Der Inhalt des 1. Becherglases wurde zu einem ca. 50°C heißen Agarosegel hinzugesetzt. Das Gel war zuvor aus 0,3 g Agarose und etwa 18 ml Aqua dest. gekocht worden. Diese Färbelösung wurde blasenfrei über die horizontal durchschnittene Gelplatte gegossen.
Die Gelplatte wurde danach für 90-120 min bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit stellten sich die jeweiligen gt-Phänotypen als dunkelblaue Bande auf hellem Grund dar.

3. Ergebnisse

3.1. ermittelte gt-Phänotypen

Insgesamt wurden nach der unter 2 beschriebenen Methode 495 Blutspuren untersucht. Dazu standen die zuvor erwähnten 55 Vollblutproben zur Verfügung. Nach der elektrophoretischen Auftrennung konnten mit Hilfe der Zymogrammtechnik folgende gt-Phänotypen festgestellt werden:

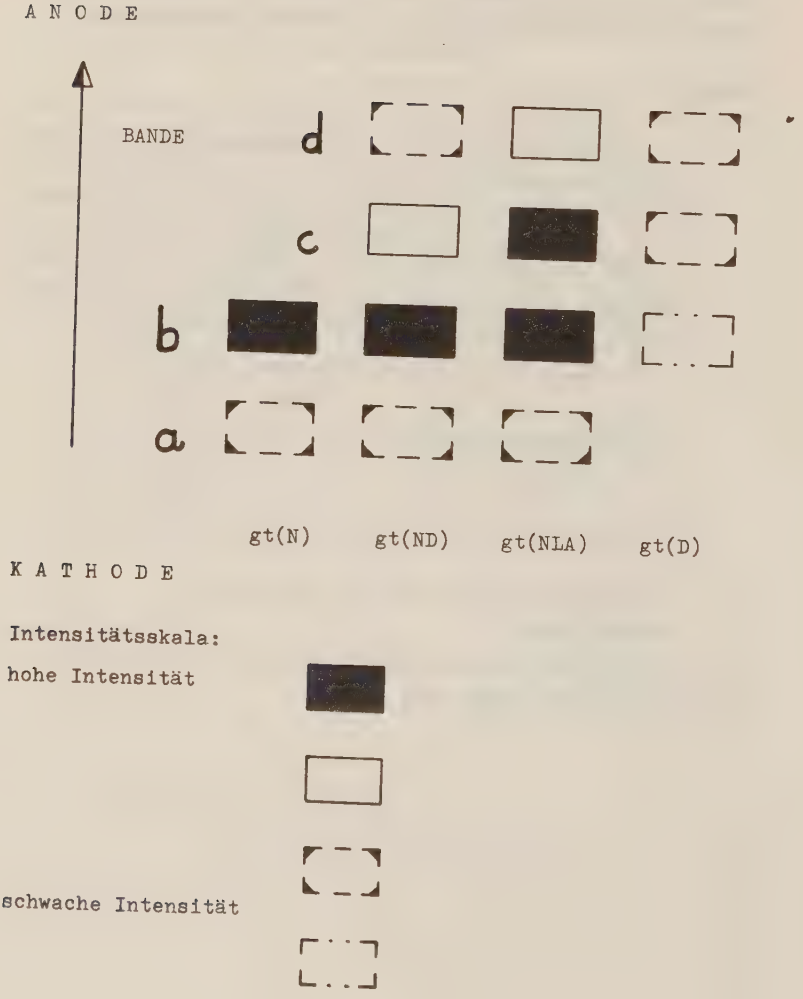
Tabelle 2. ermittelte gt-Phänotypen

Anzahl	gt-Phänotyp
26	gt(N)
13	gt(ND)
5	gt(N-LA)
11	gt(D)
gesamt 55	

3.2. Schematische Darstellung der ermittelten gt-Phänotypen

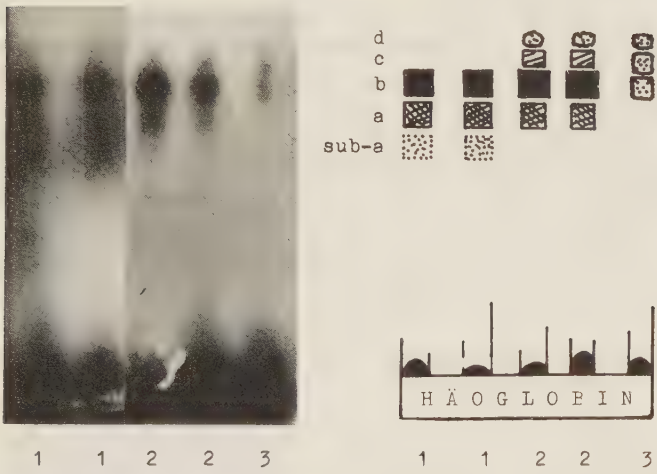
Die nachfolgende Abbildung zeigt die ermittelten gt-Phänotypen in schematischer Form.

Abbildung 2: Bandenmuster der ermittelten gt-Phänotypen (mod. nach HAASS 1980)



3.3. Photographische Darstellung eines Zymogramms mit verschiedenen gt-Phänotypen

Abbildung 3: Photo eines Zymogramms



Phänotypen: 1 = gt(N)
2 = gt(N-D)
3 = gt(N-LA)

Der in Abbildung 2 vorgestellte Phänotyp gt(D) konnte nicht photographisch festgehalten werden.

Anmerkung:

Das dargestellte Zymogramm zeigt deutlich die von HAASS (1980) erstmals beschriebene Sub-a-Bande.

3.4. Einzelergebnisse

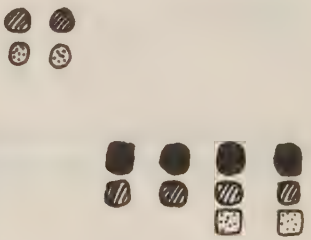
3.4.1. gt(N)

Zur Untersuchung dieses Phänotyps standen insgesamt 26 venöse Vollblutproben zur Verfügung. Daraus wurden 123 Blutspuren angefertigt.

Unabhängig von den Lagerungsbedingungen ließen fast alle 3 Stunden alten Spuren eine eindeutige Festlegung des Phänotyps zu. Lediglich 2 Blutspuren ließen sich keinem der bekannten gt-Phänotypen zuordnen. Vermutlich handelte es sich um einen Artefakt, da das parallel in das Elektrophoresegel eingesetzte Vergleichsblut eindeutig den Phänotyp gt(N) zeigte. (siehe Abb. 4)
Eine später wiederholte Untersuchung der gleichen Blutspur zeigte ein normales Zymogramm.

Abbildung 4: Zymogramm der o.g. Blutspur

1 1 2 2



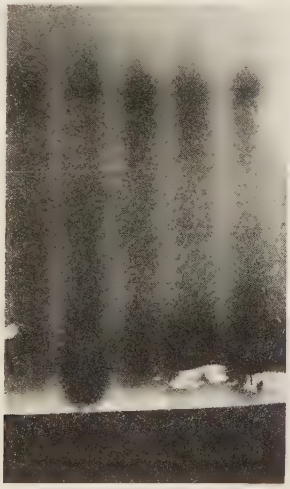
Schematische Darstellung des nebenstehenden Photos

1= nicht klassifizierbarer Phänotyp
2= Phänotyp gt(N)

Zymogramme 6 Stunden alter Blutspuren ließen eine zweifelsfreie Identifizierung zu. Allerdings waren bei einigen leichte Aktivitätsverluste zu beobachten.

Eine eindeutige Bestimmung des Phänotyps gt(N) war in den meisten Fällen nach 24 Stunden nicht mehr möglich. Eine Unterteilung der einzelnen Bande, wie sie bei 3 und 6 Stunden alten Spuren möglich war, erschien aussichtslos. Es zeigte sich eine starke Schlierenbildung, so daß keine distinkten Banden erkennbar waren.

Abbildung 5: Photo eines Zymogramms (24 Stunden alte Spur)



1 1 1

1 = Phänotyp gt(N),
24 Stunden alt

Bei 7 Spuren war auch nach 24 Stunden noch eine eindeutige Zuordnung zum Phänotyp gt(N) möglich. Es handelte sich ausnahmslos um solche Spuren, die im Kühlschrank aufbewahrt worden waren.

In 2 Fällen traten Transformationen auf. Die betreffenden Zymogramme zeigten einen scheinbaren Phänotyp gt(N-D).

3.4.2. gt(N-D)

Es standen 13 Vollblutproben des o.g. Typs zur Verfügung. Daraus wurden 117 Blutspuren angefertigt.

Fast alle 3 Stunden alten Spuren ließen sich problemlos dem Phänotyp gt(N-D) zuordnen. Bei 9 Spuren war eine Identifizierung nicht möglich. Die einzelnen Banden stellten sich nach der Anfärbung als so schwach dar, daß eine Zugehörigkeit zum Typ gt(N-D) unwahrscheinlich erschien.

Von den 39 Blutspuren des Phänotyps gt(N-D) waren nach 6 Stunden 18 aus den unter 3.4.1 und 3.4.2. genannten Gründen nicht mehr klassifizierbar.

Bei den 24 Stunden alten Spuren waren es lediglich 3 Spuren, die eine Zuordnung zum Phänotyp gt(N-D) zuließen. In einem Fall trat eine Transformation auf. Es stellte sich der scheinbare Phänotyp gt(N-LA) dar.

3.4.3. gt(N-LA)

Insgesamt konnten 5 Vollblutproben verwertet werden. Es wurden daraus 45 Spuren angefertigt.

Die Zymogramme der 3 Stunden alten Spuren waren alle eindeutig zu klassifizieren.

Von den 6 Stunden alten Blutspuren waren 3 aus den zuvor genannten Gründen nicht zu identifizieren.

Keine Zuordnung konnte bei den 24 Stunden alten Spuren getroffen werden.

3.4.4. gt(D)

Von den 11 zur Verfügung stehenden Vollblutproben des o.g. Typs konnten 99 Spuren angefertigt werden.

30 der 3 Stunden alten Spuren ließen sich ohne Schwierigkeiten dem Phänotyp gt(D) zurechnen. Lediglich 3 Spuren ließen eine Identifizierung nicht zu, da die Zymogramme eine starke Schlierenbildung aufwiesen.

Für die 6 Stunden alten Spuren gilt dasselbe, wie für die zuvor genannten. 3 der 33 Blutspuren ließen sich aus dem zuvor angeführten Grund nicht klassifizieren.

Von den 24 Stunden alten Blutspuren ließ sich überhaupt keine mehr eindeutig dem Phänotyp gt(D) zuordnen. Nur bei einer Spur konnte eine Ähnlichkeit mit dem o.g. Phänotyp nicht ausgeschlossen werden. Ansonsten war bei allen anderen die Aktivität so gering, daß nur noch eine schwache Schlierenspur im Gel erkennbar war.

4. Diskussion

4.1. Anmerkungen zur Methodik

Von den zur Zeit bekannten Untersuchungsmethoden zum Nachweis der Galaktose-1-Phosphaturidyltransferase wurde ein von SPARKES und Mitarbeitern (1977) beschriebenes Verfahren ausgewählt. Es bietet folgende Vorzüge:

Ein Einsatz bei routinemäßigen Laboruntersuchungen ist möglich. Bei sachgemäß durchgeführter Elektrophorese werden die einzelnen Enzymfraktionen klar voneinander getrennt.
Aufgrund der großzügigen Abmessung der Gelkammer können etwa 20 Blutproben pro Untersuchungsgang bestimmt werden.

Mit der von mir angewandten Zymogrammtechnik wird eine klare, deutliche Darstellung der einzelnen gt-Banden erreicht. Sie heben sich blau vom hellen Geluntergrund ab.

Als störend erwiesen sich die langen Vorbereitungszeiten der einzelnen Untersuchungsgänge sowie die lange Laufzeit der Elektrophorese. Sie betrug durchschnittlich 18 Stunden.
Zu beachten bleibt außerdem die extreme Lichtempfindlichkeit der nach der o.g. Methode gefärbten Zymogramme. Es muß jede stärkere UV-Strahlung vermieden werden. Ansonsten kommt es zu einer Blauverfärbung der gesamten Gelplatte. Dadurch wird eine Klassifizierung der einzelnen gt-Phänotypen unmöglich.

4.2. Anmerkung zum verwendeten Spurenmaterial

Bei den 495 untersuchten Blutspuren handelte es sich ausschließlich um künstliche, im Labor hergestellte Spuren. Eine Untersuchung unter realitätsnahen Bedingungen hergestellter Spuren wurde nicht durchgeführt. Sie erschien

zunächst als nicht notwendig. Gemäß der Fragestellung sollte vorrangig geklärt werden, ob ein gt-Phänotypennachweis an Blutspuren überhaupt möglich wäre. Das gewählte Untersuchungsmaterial und die oben beschriebene Methode schienen dafür geeignet.

Pro Blutspur wurde eine Menge von ca. 100 µl Vollblut verbraucht. Diese Menge hatte sich während der Vorversuche zu meiner Untersuchung als optimal herausgestellt. Sie reicht aus, um die unter 2 beschriebenen Filterpapierstreifen mit Probenmaterial zu beschicken und um gt-Phänotypen an getrockneten Spuren nachzuweisen.
Während der Untersuchung ergab sich ferner, daß weniger Spurenmaterial, aufgrund der geringeren Aktivität, zu einem Abblassen der Zymogramme führte.

4.3. Anmerkung zur Blutspurenuntersuchung in der forensischen Medizin

Eine gt-Phänotypenbestimmung an Blutspuren kann mit Hilfe der benutzten Methode grundsätzlich durchgeführt werden. Zur Frage nach dem Wert für die forensische Blutspurenkunde lassen sich folgende Feststellungen treffen:

Aus frischen Blutspuren lassen sich gt-Phänotypen auf jeden Fall bestimmen. Die Problematik bei der Untersuchung älterer Spuren wird im Kapitel 3 (Ergebnisse) deutlich. Es muß angenommen werden, daß eine Untersuchung nach einem Zeitraum von 3 Stunden problematisch wird.

Bei 6 Stunden alten Spuren ist ein gt-Phänotypennachweis nicht immer erfolgreich. Zudem scheinen zwischen den einzelnen Phänotypen Unterschiede hinsichtlich ihrer Nachweisbarkeitsgrenzen zu bestehen.

Wie die Ergebnisse weiterhin zeigen, ist eine gt-Phänotypenbestimmung an 24 Stunden alten Spuren nicht mehr

sinnvoll. Nach dieser Zeitspanne läßt sich nur noch ein verschwindend geringer Teil der ursprünglichen gt-Phänotypen nachweisen. Mit dem Auftreten von Transformationen muß gerechnet werden. Weiterhin können bedeutende Aktivitätsverluste auftreten.

Aufgrund des vorliegenden Materials kann somit dem Nachweis von gt-Phänotypen an Blutspuren lediglich ein geringer praktischer Wert beigemessen werden.
Wegen der geringen Haltbarkeit der gt im Spurenmaterial ist eine gt-Bestimmung für die forensische Praxis kaum relevant. Hierzu scheint es zumindest subtilerer Methoden zu bedürfen.
Offenbar bestätigen die getroffenen Feststellungen, daß einem gt-Phänotypennachweis in der forensischen Blutspurenkunde kaum mehr als ein geringer Informationsgehalt zukommt.

5. Zusammenfassung

Aus 55 Vollblutproben wurden 495 Blutspuren hergestellt.
An diesen Spuren konnten 4 verschiedene Phänotypen des Isoenzyms Galaktose-1-Phosphaturidyltransferase nachgewiesen werden.
Die elektrophoretischen Untersuchungen wurden mit einer von SPARKES und Mitarbeitern (1977) erstmals beschriebenen Methode ausgeführt.
Zur Darstellung der Zymogramme wurde ein von BISSBORT und KÖMPF (1973) entwickeltes Verfahren angewendet.
Die untersuchten Blutspuren wurden jeweils zu einer Serie zusammengefaßt und nach 3, 6 und 24 Stunden auf ihren Phänotyp im Isoenzymsystem der gt bestimmt. Die Untersuchungen wurden alle unter Laborbedingungen durchgeführt.
Die einzelnen gt-Phänotypen unterschieden sich beträchtlich hinsichtlich ihrer Nachweisbarkeitsgrenzen.
Es konnten lediglich frische Blutspuren problemlos untersucht werden.
Der Wert für die forensische Blutspurenkunde kann als nur gering angesehen werden.

Literaturverzeichnis

1. BERG,S.;LADIGES,M.L.: Über die Nachweisbarkeit der Tf^C und PGM_1 gealterter Blutspuren, Arch.f.Krim. 164, 101 (1979)
2. BISSBORT,S.;KÖMPF,J.: Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase: Elektrophoretische Darstellung, Z.Rechtsmed. 72, 119 (1973)
3. BRINKMANN,B.: Bestimmung der Phosphoglucomutase-Typen aus Blutspuren, Dtsch.Z.gerichtl.Med. 25, 213 (1969)
4. BRINKMANN,B.;THOMA,G.: Forensische Verwendbarkeit weiterer Enzympolymorphismen: Adenylatkinase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Adenosin-Desaminase, Beitr. gerichtl. Med. 29, (1970-1971)
5. BRINKMANN,B.;BAHMAN,M.;THOMA,G.: Der Polymorphismus der Adenylatkinase (E.C.:2.7.4.3) Genfrequenzen und Anwendbarkeit in der forensischen Serologie, Z.Rechtsmed. 68, 73 (1971)
6. BRINKMANN,B.: Erythrocytäre Enzympolymorphismen in der forensischen Serologie, Z.Rechtsmed. 69, 83 (1971)
7. BRINKMANN,B.;GÜNNEMANN,M.;KOOPS,E.: Investigations on the decay of acid phosphatase types in stored blood stains and blood samples, Z.Rechtsmed. 70, 68 (1972)
8. BRINKMANN,B.;PÜSCHEL,K.: Forensischer Anwendungsbereich der Enzympolymorphismen Esterase D und Glyoxalase I, Z.Rechtsmed. 81, 181 (1978)
9. BRINKMANN,B.;SÖDER,R.;BRINKMANN,M.: Estimating the age of bloodstains by measuring enzyme activities, 8. internationale Tagung der Gesellschaft für forensische Blutspurenkunde e.V., London (1979)
10. CULLIFORD,B.J.;WRAXALL,B.G.D.: Adenylatekinase (AK) types in bloodstains, J.forensic.Sci.Soc. 8, 19 (1968)
11. CULLIFORD,B.J.: The determination of phosphoglucomutase (PGM) types in bloodstains, J.forensic.Sci.Soc. 7, 131 (1971)

12. FILDES,R.A.;PARR,C.W.: Human red cell phosphogluconate dehydrogenase, Nature (Lond.) 200, 890 (1963)
13. FILDES,R.A.;HARRIS,H.: Gentically determined variation of adenylate kinase in man, Nature (Lond.) 209, 261 (1966)
14. HAASS,E.: Untersuchung zum Polymorphismus der Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase (E.C.:2.7.7.12) in Nordrhein-Westfalen, Dissertation aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf, (1980)
15. HAASS,E.;HENKE,J.: Untersuchung zur elektrophoretischen Stabilität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase nach Alterung unter verschiedenen Lagerungsbedingungen, 58. Jahrestag der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Münster (1979)
16. HARRIS,H.: The principles of human biochemical genetics, North-Holland Puplishing Comp.,Amsterdam (1971)
17. HAYWARD,J.;BOSWORTH,A.: Esterase D types in human blood stains, J.forensic. Sci.Soc. 15, 289 (1975)
18. HEIDEL,G.: Die spurenkundliche Bedeutung der Typen der SEP, Dtsch.Z.ges.gerichtl.Med. 63, 37 (1968)
19. HENKE,J.: Bemerkungen zur Stabilität einer Variante am 6-PGD-Locus (E.C.: 1.1.1.44), Z.Rechtsmed 83, 221 (1979)
20. HOPKINSON,D.A.;SPENCER,N.;HARRIS,H.: Red cell acid phosphatase variants; a new human polymorphismen, Nature (Lond.) 199, 969 (1963)
21. HOPKINSON,D.A.;MESTRINER,M.A.;CORTNER,J.;HARRIS,H.: Esterase D: A new human polymorphismen, Ann.hum.Genet. 37, 119 (1973)
22. KÖMPF,J.;BISSBORT,S,;GUSSMANN,S,;RITTER,H.: Polymorphism of red sell glyoxalase I (E.C.:4.4.1.5) A new gentic marker in man. Investigation of 169 mother-child combinations, Humangenetik 27, 141 (1975)
23. KÜHNL,P.;NOWICKI,L.;SPIELMANN,W.: Untersuchungen zum Polymorphismus der intraerythrocytären Esterase D (EsD) mittels Hochspannungselektrophorese auf Agarosegel, Z.Rechtsmed. 75, 179 (1974)

24. LELOIR,L.F.: The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivate, Arch. Biochem.Biophys. 33, 186 (1951)
25. MARKERT,C.L.;MØLLER,F.: Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 45, 753 (1959)
26. MISCICKA,D.;DOBOSZ,T.;RASZEJA,S.: Determination of phenotypes of phosphoglucomutase (PGM_1) in bloodstains by cellulose acetate electrophoresis, Z.Rechtsmed. 79, 197, (1977)
27. OEPEN,I.;DURÈ,V.: Dünnschicht-Stärkegel-Elektrophorese zur Bestimmung der Adenylatkinasetypen an Blutspuren, Ärztl.Lab. 16, 383 (1970)
28. OEPEN,I.: Dünnschicht-Stärkegel-Elektrophorese zur Bestimmung der Phosphoglucomutasetypen an Blutspuren, Z.Rechtsmed. 67,309 (1970)
29. OEPEN,I.;MERTENS,G.: Pseudosondertypen im Adenosin-desaminase (ADA) System, 5. Internationale Tagung der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde, Amsterdam (1973)
30. PARKINS,B.;ADAMS,E.: The typing of esterase D in human bloodstains, Med.Sci.Soc.Law 15, 102 (1975)
31. RADAM,G.: Methoden und Daten zur Anwendung genetischer Enzympolimorphismen in Gerichtsmedizin und Humangenetik, in: Fortschritte der Hämatologie, IV 185-306, hrsg. von PERLICK,E.;PLENERT,W.;PROKOP,O.;STOBBE,H., Verlg.J.A. Barth Leipzig (1977)
32. ROTHWELL,T.: The effect of storage upon the activity of phosphoglucomutase and adenylate kinase enzymes in blood samples and bloodstains, Med.Sci.Soc.Law 10, 230 (1970)
33. SCHLEYER,F.;OEPEN,I.: Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspuren-Untersuchung, Verlg. Schmidt-Römhild Lübeck (1977)
34. SCHWERD,W.: Zum Nachweis der Glyoxalase in gelagerten Blutproben, Arch.f.Krim. 165, 107 (1980)
35. SPARKES,M.C.;CHRIST,M.;SPARKES,R.S.: Improved technique for electrophoresis of human galactose-1-phosphate-uridyl-transferase, Hum.Genet. 40, 93 (1977)

36. SMERLING,M.: Bestimmung der sauren Erythrocyten-phosphatase an alten Blutalkoholproben und in Blutspuren, Arch.f.Krim. 144, 161 (1969)
37. SPENCER,N.;HOPKINSON,D.A.;HARRIS,H.: Phosphoglucomutase polymorphism in man, Nature (Lond.) 204, 741 (1964)
38. SPENCER,N.;HOPKINSON,D.A.;HARRIS,H.: Adenosine desaminase polymorphism in man, Ann.Hum.Genet. 32, 9 (1968)
39. TSUJI,T.;WEISSMANN,J.: Agarose-Dünnschicht-Elektrophorese zur Bestimmung der Adenylatkinase-Polymorphismen, Ärztl. Lab. 22, 363 (1976)
40. WEISSMANN,J.;MESSIAS DE TABORDA,I.J.;PRIBILLA,O.: Das Enzymmuster der gt (E.C.:2.7.7.12) in der Bevölkerung von Schleswig Holstein, 59. Jahrestag der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Heidelberg (1980)
41. WELCH,S.: Glutamate-pyruvate transaminase in bloodstains, J.for.Sci.Soc. 12, 605 (1972)

Herrn Prof.Dr.H.Schweitzer danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Laborplatzes im Institut für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf.

Herrn Dr.J.Henke möchte ich für die kritischen Anmerkungen bei der Durchsicht des Manuskripts danken.

Frau Flach gilt mein Dank, da sie mir bei der Durchführung meiner Versuche mit Rat und Tat zur Seite stand.

Weiterhin danke ich allen, die sich für meine Untersuchungen als Versuchspersonen zur Verfügung gestellt haben.

Lebenslauf

1951 wurde ich als Sohn des Landwirts Fritz Kramer und seiner Ehefrau Maria Kramer, geb.Mesters am 29 Dezember in Grevenstein geboren.
1958 wurde ich in die Kath.Volksschule in Grevenstein eingeschult.
1963 wechselte ich zum Staatl.Gymnasium nach Arnsberg.
1969 begann ich eine Ausbildung in der Landespolizeischule " Carl Severing " in Münster.
1972 legte ich die I.Fachprüfung ab.
1973 besuchte ich das " Siegerland-Kolleg " in Hüttental/Weidenau.
1975 erwarb ich die Allgemeine Hochschulreife und begann im gleichen Jahr das Medizinstudium an der Universität Düsseldorf.
1977 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, 1978 den I.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und 1980 den II. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
Zur Zeit bin ich Internatsstudent im Praktischen Jahr an der Universitätsklinik in Düsseldorf.

Johannes Kramer